基础研究 文章编号:0253-3626(2011)05-0553-04

Tribble3与糖尿病大鼠心肌病变的相关性研究

柴李般[1],肖 谦[1],马楼艳[1],张 颖[2],彭琼乐[3]

(1.重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016;2.重庆市渝北区人民医院公共卫生所,重庆 401120;
3.重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 TRB3(Tribble3)在糖尿病大鼠心肌组织中的表达及与心肌细胞凋亡和间质纤维化的相关性。方法:24 只 SD 雄性大鼠随机分对照组 12 只,糖尿病组 12 只。建立糖尿病大鼠模型,成模 8 周后,检测空腹血糖和糖化血红蛋白,HE 染色观察心肌组织病理改变,Masson 染色观察心肌组织间质胶原含量,Tunel 观察心肌细胞凋亡情况,荧光定量 PCR、Western blot 分别检测心肌组织 TRB3 mRNA 及蛋白水平的变化。结果:与对照组相比,糖尿病组大鼠空腹血糖及糖化血红蛋白水平明显升高($P<0.01$);心肌细胞排列紊乱,肌纤维溶解、萎缩、断裂,炎症细胞浸润;间质胶原表达增加($P<0.01$);心肌细胞凋亡明显增多($P<0.01$);心肌组织 TRB3 mRNA 及蛋白水平表达升高($P<0.01$)。相关性分析显示,TRB3 蛋白表达与心肌细胞凋亡成正相关($r=0.668$,$P<0.05$),与间质纤维化程度成正相关($r=0.595$,$P<0.05$)。结论:糖尿病大鼠心肌组织中 TRB3 mRNA 及蛋白表达增多。TRB3 可能通过促进心肌细胞凋亡,增加间质纤维含量参与糖尿病心肌病的发病机制。

【关键词】糖尿病心肌病;Tribble3;凋亡;间质纤维化

【中国图书分类法分类号】R587.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-08-18

Association between Tribble3 and diabetic cardiomyopathy in diabetic rats

CHAI Li-yin[1], XIAO Qian[1], MA Lou-yan[1], ZHANG Ying[2], PENG Qiong-le[3]

(1. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Institute of Public Health, the People's Hospital of Yubei District in Chongqing; 3. Department of Cell Biology and Heredity, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the expression of Tribble3 (TRB3) in diabetic cardiomyopathy, and the relationship between TRB3 and diabetic cardiomyopathy. *Methods*: 24 SD male rats were divided into control group ($n=12$) and diabetes group ($n=12$) randomly. Diabetes was induced by a single peritoneal injection of strepotozotocin (STZ, 60 mg/kg). 8 weeks later, blood sugar and HbAc1 were tested.

作者介绍:柴李般(1987-),女,硕士,
研究方向:糖尿病慢性并发症。

通信作者:肖 谦,男,教授,Email:xiaoqian1956@126.com。

hepatitis B vaccination[J].Hepatology,2004,39(1):58-63.

[7] Terazawa S,Kojima M,Yamanaka T,et al.Hepatitis B virus mutants with precore-region defects in two babies with fulminant hepatitis and their mothers positive for antibody to hepatitis B e antigen[J].Pediatr Res,1991,29(1):5-9.

[8] 于贤杰,刘 敏,杨慧霞,等.慢性 HBV 感染产妇胎儿脐带血单核细胞 PD-L1 的表达[J].世界华人消化杂志,2008,16(18):2061-2064.

[9] Chen L Z,Zhang Z,Chen W,et al.B7-H1 upregulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B[J].J Immunol,2007,178(10):6634-6641.

[10] Geng L,Jiang G,Fang Y,et al.B7-H1 expression is upregulated in peripheral blood CD14$^+$ monocytes of patients with chronic hepatitis B virus infection,which correlates with higher serum IL-10 levels[J].J Viral Hepat,2006,13(11):725-733.

[11] Stoop J N,van der Molen R G,Baan C C,et al.Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection[J].Hepatology,2005,41(4):771-778.

[12] Stoop J N,Woltman A M,Biesta P J,et al.Tumor necrosis factor alpha inhibits the suppressive effect of regulatory T cells on the hepatitis B virus-specific immune response[J].Hepatology,2007,46(3):699-705.

[13] Peng G,Li S,Wu W,et al.Circulating CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection[J].Immunology,2008,123(1):57-65.

[14] Xu D,Fu J,Jin L,et al.Circulating and liver resident CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B[J].J Immunol,2006,177(1):739-747.

[15] 福军亮,徐东平,赵 平,等.急慢性乙型肝炎患者外周血调节性 T 细胞鉴定与临床意义[J].中华医学杂志,2006,86(22):1522-1525.

[16] 福军亮,徐东平,施 明,等.乙型肝炎患者外周血 CD4$^+$CD25$^+$ 调节性 T 细胞表型与功能分析[J].中华内科杂志,2006,45(8):642-645.

(责任编辑:关蕴良)

The changes of myocardium organization structure were observed by HE.Interstitial fibrosis was detected by Masson.Apoptosis of cardiomyocyte determined by Tunel.TRB3 of each group was tested by quantitative real time-PCR and Western blot separately. *Results*: Compared with control group,there were such changes in diabetes group as the disorder and fracture of cardiocytes,and infiltration of inflammatory cells. There were more myocardial collagen content ($P<0.01$) and much more apoptosis of cardiomyocyte ($P<0.01$) in the hearts of diabetic rats. The expression of TRB3 in protein and mRNA was up-regulated ($P<0.01$). Significant positive correlations were observed between TRB3 protein and apoptosis ($r=0.668$, $P<0.05$),and between TRB3 protein and interstitial fibrosis ($r=0.595$, $P<0.05$). *Conclusion*: There are obviously increasing of protein and mRNA of TRB3 in diabetic cardiomyopathy.TRB3 may promote the development of diabetic cardiomyopathy by inducing apoptosis of cardiac myocyte and enhancing interstitial fibrosis.

【Key words】diabetic dardiomyopathy;tribble3;apoptosis;interstitial fibrosis

糖尿病心肌病是糖尿病慢性并发症之一，临床早期表现为心肌顺应性降低和舒张期充盈受阻引起的舒张功能不全，晚期以收缩功能不全为主，易发生充血性心力衰竭，其病理变化主要表现为心肌细胞的凋亡及心肌间质重构，其发病机制主要与代谢异常，氧化应激，细胞因子等作用有关，但具体机制仍不清楚。TRB3（Tribble3）是新近发现的哺乳动物同源基因，在信号通路中起脚手架蛋白的作用，广泛参与糖脂代谢、氧化应激和胰岛素抵抗，与糖尿病发病机制密切相关[1]。最新研究显示：TRB3 通过负向调节单核细胞趋化蛋白-1 的表达参与糖尿病肾病的发病[2]。Avery J 等[3]研究发现心梗模型大鼠的梗死区 TRB3 表达明显增高，转染 TRB3 到梗死区可扩大梗死范围，使心肌收缩力下降，表明 TRB3 是加重心肌病变的因素。因此我们推测 TRB3 可能参与糖尿病心肌病的致病过程。但目前国内外关于 TRB3 与糖尿病心肌病的研究甚少。本文以 SD 大鼠为研究对象，观察 TRB3 在糖尿病心肌组织中表达变化，以及其与心肌细胞凋亡和间质胶原含量的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物与造模

8 周龄的 SD 雄性大鼠 24 只，体质量 180~200 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，饲养于清洁级动物实验室、普通饮食喂养、自由饮食。24 只 SD 大鼠随机分成对照组 12 只、糖尿病组 12 只，普通饲料适应性喂养 1 周后开始造模。柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制 STZ（美国 Alexis 公司），浓度为 10 mg/ml。糖尿病组大鼠禁食 12 h，腹腔一次性注射 STZ 溶液 60 mg/kg；3 d 后尾尖取血检测随机血糖。血糖>16.7 mmol/L 纳入实验，而后两组大鼠均予以普通饮食喂养。成模 8 周后，处死对照组 12 只，糖尿病组 12 只，留取血液及左心室标本。

1.2 造模成功的鉴定

1.2.1 血糖及糖化血红蛋白含量测量 血液标本送重庆医科大学附属第一医院检验科检测糖化血红蛋白。罗氏血糖仪检测各组血糖变化。

1.2.2 HE 染色 分别取对照组、糖尿病组左心室心脏组织，4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，制片，HE 染色，400×光镜下对比观察，拍照。

1.2.3 Masson 染色 分别取对照组、糖尿病病组左心室组织，4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，制片，Masson 染色，光镜下观察心肌细胞呈红色或黄色，纤维组织呈蓝色，200×光镜下对比观察，拍照，采用 IPP6.0 图像分析仪定量心肌胶原含量。

1.2.4 原位细胞凋亡检测（Tunel） 分别取对照组、糖尿病组左心室组织，4%多聚甲醛固定，常规石蜡包埋，制片，Tunel 染色，光镜下心肌细胞胞浆呈无色或淡黄色，正常细胞核呈蓝色，凋亡细胞核呈棕色，400×光镜下对比观察，拍照。每张片子任选 5 个视野，计算出每张片子凋亡细胞/正常细胞的比值为凋亡指数。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测 TRB3 表达

（1）总 RNA 的提取与纯度鉴定：Trizol（购自 Takara 公司）试剂提取组织总 RNA，紫外分光光度计检测 RNA 并行 RNA 浓度检测和完整性鉴定。（2）总 RNA 逆转录成 cDNA：逆转录反应采用反转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链。反应体系 10 μl，37℃孵育 60 min。逆转录试剂盒购自天根生物公司。（3）荧光定量 PCR：采用 SYBR Green 染料法。所有引物序列由（上海生工设计合成）。目的基因 TRB3 上游引物 5'-TGATGCTGTCTGGATGACAA-3'，下游引物：5'-GTGAATGGGGACTTTGGTCT-3'，产物长度 196 bp。内参基因 β-actin 上游引物：5'-CCATGTTCGTCATGGGTGTGAAC-CA-3'，下游引物：5'-GCCAGTAGAGGC-AGGGATGATG0TT-C-3'产物长度 251 bp。反应体系为 25 μl，PCR 反应条 2 件：①94℃预变性 2 min；②94℃变性 30 s；③55℃退火温度 30 s；④72℃延伸 1 min，40 个循环；⑤72℃再延伸 10 min。根据以下公式以 Ct 值计算各基因的起始模板浓度：$2^{-\Delta\Delta Q}$ [-△△Ct=（糖尿病组 TRB3Ct-对照组 TRB3Ct）-（糖尿病组 β-actin Ct-对照组 β-actin Ct）]。

1.4 Western blot 检测 TRB3 的蛋白水平表达

将组织匀浆后，用 RIPA 强裂解液（购自碧云天）裂解组织匀浆产物，离心，吸取上清液，用 BCA 法测蛋白浓度。上样前将样品在 100℃水浴中变性 10 min，每个加样孔中蛋白上样量为 120 μg。参照碧云天配胶试剂盒说明书指示，使用上层 5%SDS 聚丙烯酰胺凝胶浓缩胶，下层 12%分离胶进行电泳。电泳采用 80 V 恒压一跑到底的方法。将电泳后的凝胶转移至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 37℃ 2 h，TRB3 一抗 4℃过夜，5%PBST 洗膜，每次 10 min，共 3 次，二抗使用山羊抗兔 IgG 37℃ 1 h，应用上述洗膜方法洗膜，ECL 法发光，采用凝胶

间质重构。本实验以 SD 大鼠为实验对象建立糖尿病大鼠模型，成模 8 周后，糖尿病组大鼠心肌组织出现细胞排列紊乱，肌纤维溶解，断裂，炎症细胞浸润，间质胶原表达增多，小血管扩张，细胞凋亡增加。这些表现符合糖尿病心肌组织病理变化特点。

TRB3 是 1999 年在果蝇体内发现的哺乳动物同源基因，参与调节应激反应，细胞生长，代谢过程等，在正常心肌组织中有少量的表达。TRB3 基因定位于人类 20p12.2-p13，此位置同时含有糖尿病相关基因，提示 TRB3 可能与糖尿病的发病有关[4]。Prudente S 等[5]对高加索人 TRB3 基因多态性分析显示 TRB3 基因高表达可能是心血管危险事件发生的高危因素之一。但 TRB3 是否参与糖尿病心肌病的发病尚不清楚。

在研究中，我们应用荧光定量 PCR 及 Western blot 对 2 组心肌组织 TRB3 mRNA 及蛋白表达进行检测，观察到糖尿病大鼠较对照组大鼠心肌组织 TRB3mRNA 及蛋白表达明显增高，提示高糖可能激活心肌组织中相关信号通路，使胞核 TRB3 mRNA 及蛋白表达增高，参与糖尿病心肌病的发病。我们对心肌组织 TRB3 蛋白表达与心肌细胞凋亡程度及间质纤维化程度进行相关性分析发现，TRB3 蛋白表达与两者均成正相关，提示 TRB3 可能通过促进心肌细胞的凋亡，增加间质胶原纤维的表达参与糖尿病心肌病的致病过程。

我们的研究虽然观察到 TRB3 与糖尿病心肌病变的发病有关，但是机制尚不明确，结合国内外相关文献，我们推测 TRB3 可能通过以下机制参与糖尿病心肌病变：(1)胰岛素抵抗。有学者发现胰岛素抵抗是糖尿病心肌病的发病机制之一[6]，胰岛素作用不足可导致心肌肥大、凋亡增加、间质胶原增生、心功能不全等。有研究显示，TRB3 是产生胰岛素抵抗原因之一[7,8]。因此 TRB3 可能通过加重心肌组织胰岛素抵抗参与心肌细胞凋亡，间质纤维化过程。(2)转化生长因子 TGFβ1。糖尿病心肌组织中高表达的 TGFβ1 是糖尿病心肌病重要的致病因子。最近两项对 TGFβ1 与 TRB3 的关系实验发现[9,10]，TRB3 是 TGFβ1 上游调节因子，可以通过增加 TGFβ1 表达，稳定 smads 蛋白两种方式调节 TGFβ1 信号通路。在心肌组织中高表达的 TRB3 有可能通过调控 TGFβ1 信号通路参与糖尿病心肌病的发生。(3)内质网应激。内质网应激可介导心肌细胞的凋亡及心脏间质重塑，是糖尿病心肌病的发病机制之一[11,12]。TRB3 作为内质网应激的效应蛋白之一，有可能被相关信号通路激活，参与内质网应激的所致的糖尿病心肌病变过程[3]。

本研究结果提示糖尿病心肌组织中高表达的 TRB3 可能通过促进心肌细胞凋亡，增加间质纤维含量参与糖尿病心肌病的发病过程。然而 TRB3 参与糖尿病心肌病发病的确切机制仍不明了。TRB3 作为脚手架蛋白，与多种信号通路有相互作用，其通路中转作用不容忽视，相信随着研究的深入，TRB3 有可能成为将来药物治疗的又一靶点。

参 考 文 献

[1] 周 颖，张令强，贺福初. TRB3-信号通路中一个新的脚手架蛋白[J].生命的化学，2007，27(4)：294-296.

[2] Kanwar Y S.TRB3：an oxidant stress-induced pseudokinase with a potential to negatively modulate MCP-1 cytokine in diabetic neuphropathy [J].Am J Physiol Renal Physiol，2010，299(5)：965-972.

[3] Avery J，Etzion S，DeBosch B J，et al.TRB3 function in cardiac endoplasmic reticulum stress[J].Circ Res，2010，106(9)：1516-1523.

[4] Du k，Herzbg S，kulkarni R N，et al.TRB3：a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver[J].Science，2003，300(5625)：1574-1577.

[5] Liew C W，Bochenski J，Kawamori D，et al.The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells[J].J Clin Invest，2010，120(8)：2876-2888.

[6] 赵柯湘，肖 谦，刘清秀，等.胰岛素抵抗和 2 型糖尿病大鼠心肌组织变化的研究[J].四川大学学报·医学版，2008，39(3)：402-405.

[7] Matos A，Ropelle E R，Pauli J R，et al.Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice[J].Acta Physiol(Oxf)，2010，198(1)：61-69.

[8] Lima A F，Ropelle ER，Pauli J R，et al.Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice[J].J Cell Physiol，2009，221(1)：92-97.

[9] Chan M C，Nguyen P H，Davis B N，et al.A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein(BMP)signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type Ⅱ receptor[J].Mol Cell Biol，2007，27(16)：5776-5789.

[10] Zhou Y，Li L，Liu Q，et al.E3 ubiquitin ligase SIAH1 mediates ubiquitination and degradation of TRB3[J].Cell Signal，2008，20(5)：942-948.

[11] Li Z，Zhang T，Dai H，et al.Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats[J].J Endocrinol.2008，196(3)：565-572.

[12] Li J，Zhu H，Shen E，et al.Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation，inhibits endoplasmic reticulum stress，and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes[J].Diabetes，2010，59(8)：2033-2042.

（责任编辑：关蕴良）